

Universidad Pública de Navarra

Nafarroako Unibertsitate Publikoa

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE
INGENIEROS AGRÓNOMOS**

***NEKAZARITZAKO INGENLARIEN GOI
MAILAKO ESKOLA TEKNIKO***

**EFFECTO DEL TIEMPO DE CONSERVACIÓN EN LA OXIDACIÓN PROTEICA DE
LA CARNE DE POTRO**

Presentado por

AMAIA FERNÁNDEZ SILVESTRE

GRADO EN INNOVACIÓN DE PROCESOS Y PRODUCTOS ALIMENTARIOS

JULIO, 2016

RESUMEN

En el presente trabajo se ha estudiado cómo afecta el tiempo de conservación (TC) en los parámetros de oxidación proteica (OP) en la carne de potro. Para ello se empleó carne procedente de 12 potros (7 hembras y 5 machos) criados de forma extensiva y suplementados durante los 100 últimos días previos al sacrificio con pienso enriquecido con semillas de lino. Una vez los potros alcanzaron los 26 meses de edad fueron sacrificados. A las 24 horas *post-mortem*, se extrajo el músculo *Longissimus dorsi* de la canal izquierda y se cortó en filetes, los cuales se envasaron a vacío y se conservaron en refrigeración (2°C) durante los días 0 (día del corte), 4, 8, 12, 15 y 18. Una vez alcanzados dichos tiempos, los filetes fueron conservados a -20°C hasta el día de análisis.

Para la determinación de la OP se empleó el método descrito por Oliver, Ahn, Moermans, Goldstein, & Stadtman (1987), modificado por Vourela et al. (2005). Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico R-commander.

Los resultados demostraron que el sexo de los animales no afectó a los parámetros de OP y por el contrario, el TC sí afectó significativamente a dichos parámetros causando una pérdida de calidad de la carne de potro. Sin embargo, la evolución de la OP a lo largo del TC no siguió un patrón claro.

Palabras clave: Oxidación proteica, tiempo de conservación, carbonilos, carne de potro, calidad de la carne.

ABSTRACT

In this research it has studied how it affects the conservation time (TC) in the protein oxidation (OP) parameters in the foal meat. It employed meat from 12 foals (7 females and 5 males) grown in extensive system and fed for the last 100 days before slaughter with fodders made-up with flax seeds. When the foals were 26 months of age were slaughtered. After 24 hours *post-mortem*, it caught the muscle *Longissimus dorsi* of the left carcass and it cut in steaks which they were packaged in vacuum and they were preserved in refrigeration (2°C) for the following days: 0 (cut day), 4, 8, 12, 15, 18. When the refrigeration times finished, the steaks were kept to -20°C until the analysis day.

To determinate of OP it used the described method by Oliver, Ahn, Moermans, Goldstein, & Stadtman (1987), modified by Vourela et al. (2005). The statistic analysis were done with the statistic package R-commander.

The researches evidenced that sex didn't influence in the parameters of OP. In the other hand the TC influenced in the parameters of OP and moreover decrease the quality of the foal meat. However the evolution of the OP during the TC didn't follow a clear standard.

Key words: protein oxidation, conservation time, carbonyls, foal meat, meat quality.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dar las gracias al proyecto de investigación “Estudio de la maduración y de la vida útil del color de la carne de potro. Percepción y calidad comercial de la carne de potro mediante la valoración del producto con consumidores”, ya que, por él ha surgido el presente trabajo.

Agradecer especialmente a mi tutora M^a Victoria Sarriés por su dedicación y ayuda a lo largo de todo el proyecto.

También agradecer a Susana García y María Benavent por enseñarme la técnica empleada y ayudarme.

Por último agradecer a mi familia, mis amigas y a David su apoyo durante todo este tiempo.

ÍNDICE

1	Introducción.....	1
1.1	Carne de caballo.....	2
1.1.1	Producción de carne de caballo	2
1.1.2	Características de la carne de callo.....	4
1.1.3	Calidad organoléptica de la carne de caballo	6
1.1.4	Sistema de producción de carne de caballo	7
1.2	Oxidación proteica.....	8
1.2.1	Mecanismos químicos y factores.....	8
1.2.1.1	Oxidación proteica: mecanismos generales	8
1.2.1.2	Carbonilación proteica como expresión de la oxidación proteica....	10
1.2.1.3	Carbonilación de proteínas cárnicas: mecanismos específicos	12
1.2.2	Evaluación de la carbonilación de proteínas	14
1.2.3	Reactividad de los carbonilos proteicos.	15
1.2.4	Carbonilación de proteínas en la carne.....	16
1.2.5	Impacto de la carbonilación proteica en la calidad de la carne	17
1.2.5.1	Impacto sobre la funcionalidad de las proteínas cárnicas	18
1.2.5.2	Impacto sobre el valor nutritivo	18
1.2.5.3	Impacto sobre las características sensoriales	18
1.2.6	Estrategias para proteger las proteínas cárnicas del deterioro oxidativo ..	19
2	Objetivos.....	20
3	Material y método.....	20
3.1	Material animal	20
3.2	Sacrificio de los animales	22
3.3	Conservación muestras	22
3.4	Determinación oxidación proteica	23

3.5	Análisis estadístico	24
4	Resultados y discusión	25
4.1	Efecto del sexo y del tiempo de conservación en los carbonilos proteicos	25
5	Conclusiones.....	28
6	Bibliografía.....	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química media de la carne de potro (g/100 g de carne)	4
Tabla 2. Contenido de aminoácidos en la carne de potro (media \pm desviación estándar) 5	
Tabla 3. Composición del pienso (%), compuestos analizados (%) y composición de ácidos grasos (%).	21
Tabla 4. Nivel de significación de cada factor respecto al contenido de carbonilos proteicos en la carne de potro	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción mundial de carne de potro por continentes de 1965-2013..	3
Figura 2. Producción de carne a nivel mundial por especies en 2013.....	3
Figura 3. Producción de la carne de caballo en España del 1993 al 2013.....	4
Figura 4. Reacciones formación de radicales libres	9
Figura 5. Formación de carbonilos en proteínas cárnicas	10
Figura 6. Reacción de Fenton.....	11
Figura 7. Modificación de las cadenas laterales de aminoácidos como consecuencia de las reacciones de oxidación	11
Figura 8. Vía de formación de carbonilos de proteínas específicas, semialdheídos α -aminoadípico y γ -glutámico, (AAS y SGG, respectivamente).....	12
Figura 9. Implicación en reacciones posteriores de un carbonilo específico (AAS).....	16
Figura 10. Canal izquierda 24 horas post-mortem	22
Figura 11. Pieza dorsal donde se encuentra el músculo <i>longissimus dorsi</i>	23
Figura 12. Filete de 2,5 cm de grosor de <i>longissimus dorsi</i>	23
Figura 13. Evolución de los carbonilos proteicos a lo largo del tiempo de conservación. Gráfico de líneas con barras de error y medias de los distintos tiempos de conservación (TC).	26

LISTA DE ABREVIATURAS

Tiempo de conservación: TC

Oxidación proteica: OP

Carbonilos proteicos: CP

Semialdehído α -aminoadípico: AAS

Semialdehído γ -glutámico: GGS

2,4- dinitrofenilhidrazina: DNPH

Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas: FAO

Cromatografía líquida de alta resolución: HPLC

1 INTRODUCCIÓN

Las proteínas juegan un papel decisivo en los productos cárnicos respecto a calidad sensorial, calidad nutricional y aspectos tecnológicos (Lawrie, 1998). La oxidación de las proteínas es uno de los campos de investigación más innovadores dentro de la Ciencia y Tecnología de los alimentos. Sin embargo, la ausencia de conocimientos científicos básicos sobre la oxidación de proteínas y de técnicas analíticas específicas explica que, durante varias décadas, se haya ignorado que las proteínas de la carne son, como los lípidos, muy susceptibles a las reacciones de oxidación (Estevez, Morcuende, Ventanas, & Ventanas, 2012).

La oxidación proteica (OP) de la carne es una de las principales causas de deterioro químico de los alimentos especialmente por modificar la composición de los aminoácidos. Como consecuencia de ello, se generan grupos carbonilos libres que pueden afectar negativamente a la calidad organoléptica de la carne, haciendo que el alimento no resulte atractivo para el consumidor, produciendo su rechazo y reduciendo su vida útil. Estos grupos carbonilo se emplean generalmente como marcadores químicos de la OP, se reconocen como una de las modificaciones químicas más notables en la OP (Estévez, 2011).

Es importante destacar que la carne de potro se considera una de las más magras y de mayor contenido proteico. Posee un gran valor nutritivo con un bajo contenido en grasas y un moderado aporte calórico (Sarriés, Ruiz, Beriain, & Pérez de Muniáin, 2014). A pesar de su alto valor nutritivo, en España, el consumo de carne de potro es marginal (Domínguez & Lorenzo, 2015). La carne equina se caracteriza por una baja durabilidad y se degrada muy fácilmente, además es una de las menos investigadas, existen pocos trabajos que estudien la evolución de la calidad de la carne de potro conservada en refrigeración con el transcurso del tiempo (Sarriés et al., 2014).

El objetivo general de este trabajo es conocer cómo afecta el tiempo de conservación (TC) en la oxidación proteica (OP), a partir de 12 muestras de carne de potro (5 machos y 7 hembras) conservados en 6 tiempos de estudio de conservación diferentes (TC0, TC4, TC8, TC12, TC15, TC18). Por otro lado, el objetivo específico del trabajo es conocer si el sexo de los animales empleados afecta a los resultados obtenidos.

El presente Trabajo Final de Grado forma parte de un Proyecto de investigación titulado “Estudio de la maduración y de la vida útil del color de la carne de potro. Percepción y calidad comercial de la carne de potro mediante la valoración del producto con consumidores”. Dicho proyecto ha sido financiado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) cuya referencia es RTA2012-00090-C03-02, correspondiente a la Convocatoria 2012 dentro del Subprograma de Proyectos de Investigación Fundamental orientada a los recursos y tecnologías Agrarias en coordinación con las Comunidades Autónomas.

1.1 CARNE DE CABALLO

El consumo de carne de caballo se ha interrumpido a largo de la historia debido a razones religiosas, sociales y/o culturales (Fernández de Labastida, 2011). Como consecuencia de ello, no se contempla como una carne muy popular y por lo general se asocia con las clases sociales pobres, el hambre y los períodos de suministro de alimentos a corto. En la actualidad, este animal puede generar emociones positivas, como el afecto, la cercanía o sensibilidad, y por esta razón los caballos son considerados como una mascota, debido a ello su consumo ha bajado aún más en varios países (Belaunzaran et al., 2015).

Históricamente, las razas de caballos utilizados para la producción de carne procedían de animales viejos utilizados para el trabajo en la granja, mientras que los caballos hoy en día son seleccionados y criados para la producción de carne (Tateo, De pablo, Ceci, & Centoducati, 2008), en el caso de Navarra se emplea la Jaca Navarra y el Burguete (Sarriés, 2005). Por otra parte, la producción de carne procede generalmente de los animales jóvenes que se caracterizan por altos rendimientos carniceros (Tateo et al., 2008). En el caso de la raza Burguete los rendimientos oscilan alrededor del 65 % (Sarriés & Beriain, 2005).

Actualmente, los consumidores demandan carnes alternativas. La carne de caballo puede jugar un gran rol en este contexto, como una carne roja alternativa a la carne de ternera, referida a ella como carne “dietética”. Además, el consumo regular de carne de caballo puede contribuir a reducir los niveles de colesterol LDL y mejorar el índice de omega-3, ácido docosahexaenoico (DHA) y niveles de hierro (Lorenzo et al., 2013).

1.1.1 Producción de carne de caballo

De acuerdo con la información proporcionada por la Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas (FAO), la producción de carne de caballo en todo el mundo se ha mantenido bastante constante entre 1965 y 1990 a un promedio de 500.000 toneladas por año (FAO, 2015). Desde ese momento, debido al aumento de la producción de Asia y Europa, la producción de carne de caballo en general ha aumentado en un 40%, con un promedio de 700.000 toneladas por año (Figura 1). Comparándola con la producción de otras carnes, actualmente la producción de la carne de potro solo representa un 0,25% del total de la producción de carne de todo el mundo (Figura 2;FAO, 2015).

La producción por continentes muestra que un 46% de la carne de caballo es producida en Asia, un 30% en América, un 18% en Europa, un 4% en Oceanía y un 2% en África. Analizando individualmente los países los mayores productores son China, Kazajistán, Méjico y Rusia.

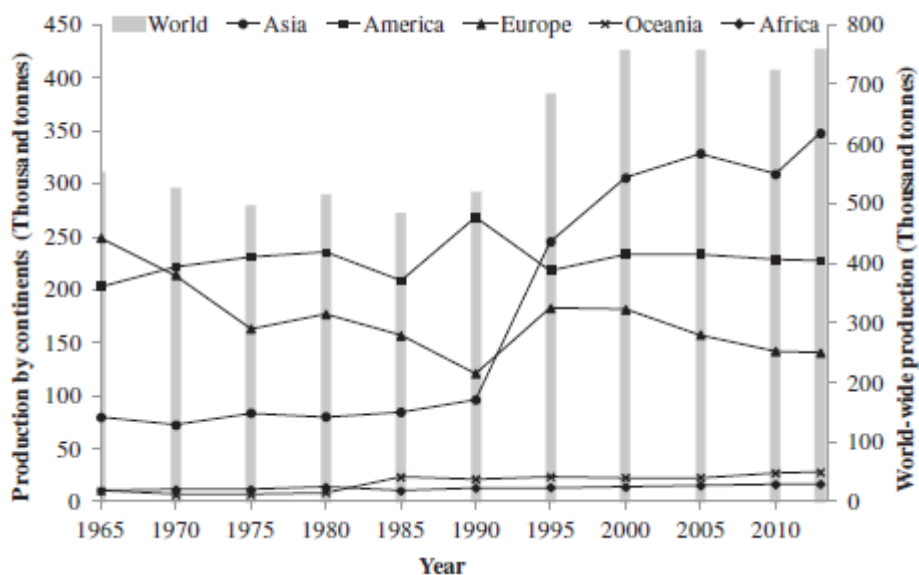


Figura 1. Producción mundial de carne de potro por continentes de 1965-2013. Las líneas representan la producción por continente con eje en la izquierda en miles de toneladas, mientras que las barras representan la producción mundial total con eje en la derecha en miles de toneladas (Belaunzaran et al., 2015).

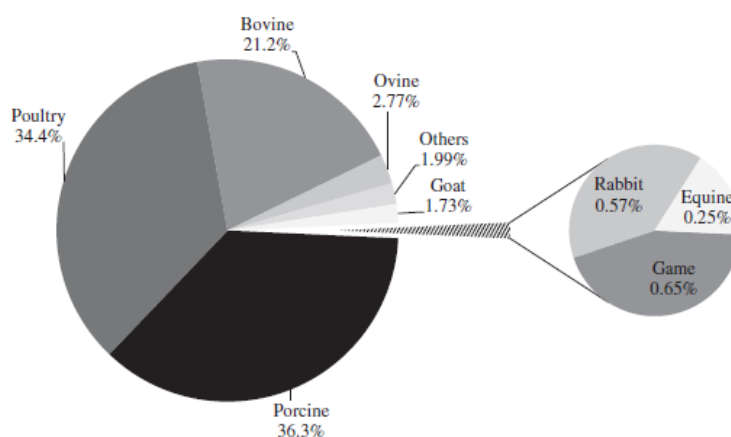


Figura 2. Producción de carne a nivel mundial por especies en 2013 (Belaunzaran et al., 2015)

Se calcula que el suministro medio de carne de caballo en todo el mundo es de unos 0,10 kg per cápita (Belaunzaran et al., 2015). Los países donde el suministro de carne de caballo alcanza valores per cápita claramente por encima de la media mundial son principalmente Mongolia (5,81 kg), Kazajistán (4,92 kg), Kirguistán (3,50 kg) e Islandia (2,19 kg) (Belaunzaran et al., 2015).

En España la producción de carne de caballo supone el 0,12%, estabilizado en torno a 7.000 toneladas/año entre 2000-2012 (FAO, 2014), se localiza principalmente en

Cataluña y la Comunidad Valenciana (Fábregas, 2002). Como ocurre con otras especies de abasto, cada zona geográfica está asociada a una raza equina y tipo de manejo, lo que se traduce en una gran variabilidad en la calidad de la carne. En la Figura 3 se muestra la producción de la carne de caballo en España durante 20 años. A partir del 2007 se ve un incremento en la producción, aunque en el 2013 hay una disminución.

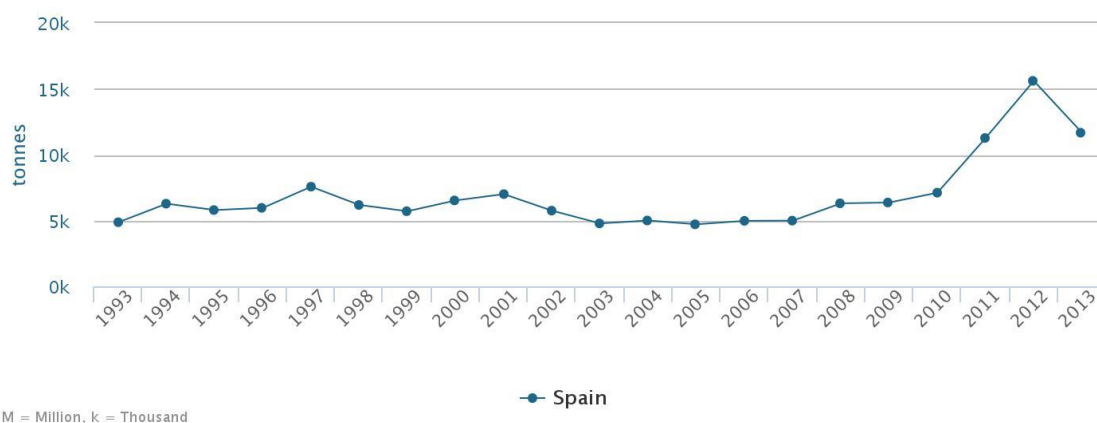


Figura 3. Producción de la carne de caballo en España del 1993 al 2013 (FAO, 2016)

1.1.2 Características de la carne de callo

La composición química de la carne de caballo se ve afectada por varios factores: la edad de sacrificio, raza, sexo y sistema de producción (Lorenzo et al., 2013). La carne de caballo contiene una gran cantidad de agua, alrededor del 75% de su composición. El segundo componente mayoritario es la proteína 23% (Rossier, 1998), la carne de caballo es una excelente fuente de proteínas de alto valor biológico, ya que contiene aminoácidos esenciales en proporciones adecuadas (Lorenzo et al., 2013). En la Tabla 2 se puede observar el contenido de aminoácidos de la carne de potro. Los hidratos de carbono representan alrededor del 1%, el carbohidrato mayoritario es el glucógeno (1,77 g/100g) (Sarriés & Beriain, 2005). Este contenido alto de glucógeno da a la carne de caballo un sabor dulzón (Rossier, 1998). Las grasas se encuentran en muy baja cantidad, alrededor del 2% (Rossier, 1998). Esto se traduce en que su aporte calórico por 100 g de carne no llegue a los 504 kJ (inferior que en carnes de cerdo, vacuno o pollo). Su composición química (Tabla 1) hace que la carne de potro sea indicada para ser utilizada en la dieta mediterránea y en los actuales regímenes ligeros de alimentación seguidos por la población.

Tabla 1. Composición química media de la carne de potro (g/100 g de carne) (Rossier, 1998)

Composición (g/100g de carne)	Valor medio
Agua (g)	75
Proteína (g)	23
Lípidos (g)	2
Carbohidratos (g)	1
Energía kJ	462-504

Tabla 2. Contenido de aminoácidos en la carne de potro (media \pm desviación estándar) (Lorenzo & Pateiro, 2013)

Aminoácido esencial	Composición aminoacídica (g/100 g proteína)
Lisina	9,15 \pm 0,22
Leucina	8,54 \pm 0,18
Arginina	6,48 \pm 0,75
Valina	5,32 \pm 0,08
Isoleucina	5,23 \pm 0,35
Treonina	5,09 \pm 0,22
Histidina	4,60 \pm 0,27
Fenilalanina	4,32 \pm 0,09
Metionina	1,45 \pm 0,26
Aminoácido no esencial	
Ácido glutámico	15,32 \pm 0,21
Ácido aspártico	9,61 \pm 0,21
Alanina	5,97 \pm 0,12
Glicina	4,37 \pm 0,20
Serina	4,06 \pm 0,10
Prolina	3,92 \pm 0,18
Tirosina	3,46 \pm 0,27

En cuanto a su valor nutritivo, se caracteriza por un contenido bajo en grasa y un perfil de ácidos grasos favorable caracterizado por una proporción significativa de ácidos grasos insaturados, aunque los ácidos grasos monoinsaturados son en muchos casos predominante (Sarriés & Beriain, 2005), rara vez se muestran en proporciones más altas que ácidos saturados y poliinsaturados (Lorenzo et al., 2013). Estudios recientes sobre la composición intramuscular de ácidos grasos en potros mostraron que los ácidos grasos saturados en el músculo *longissimus* presentan la proporción más alta (36-45%) en comparación con los ácidos grasos monoinsaturados (18-41%) y los poliinsaturados (21-41,5%). Dentro de los ácidos grasos saturados, palmítico y esteárico son los predominantes mientras que en el caso de los monoinsaturados el ácido oleico representa un 70-87% y el palmitoleico alrededor de un 3-18%. Entre los ácidos grasos poliinsaturados el linoleico es el principal. Otros estudios mostraron a los ácidos grasos poliinsaturados como ácidos grasos predominantes (40,5-48,2%), en potros criados en un sistema extensivo (Lorenzo et al., 2013). En cuanto al colesterol, presenta una media

de 61 mg/100 g de carne de potro. Sobre la base de un consumo diario de un filete de 150 g, recortado de todas las grasas visibles, la carne de potro proporciona 85-95 mg de colesterol (Lorenzo & Pateiro, 2013), lo que representa 28-31% de las recomendaciones máximas diarias de colesterol (300 mg / día) (USDA, 2013).

Una característica importante es que la carne de potro constituye una importante fuente dietética de hierro hemo (4-5 mg/ 100 g de carne fresca), tres veces más que la carne de ternera. Además es un hierro de alto coeficiente de absorción (Sarriés et al., 2014). También es una buena fuente de zinc (6 mg/ 100 g porción comestible), que al igual que el hierro se encuentra de una forma muy biodisponible. Destaca también el contenido en fósforo (200 mg/ 100 g porción comestible). Por otro lado, es fuente de vitaminas, especialmente del grupo B, tiamina (0,07 mg/100 g porción comestible), riboflavina (0,07 mg/100 g porción comestible), niacina (5,54 mg/100 g porción comestible) y B₁₂ (2,08 mg/100 g porción comestible) (Badiani et al., 1997).

A pesar de su alto valor nutritivo, en España no es una carne muy conocida ni consumida (Sarriés et al., 2014).

1.1.3 Calidad organoléptica de la carne de caballo

En lo que respecta a la calidad organoléptica de la carne de potro, es quizás la especie de consumo menos estudiada, siendo comparada con la carne de bovino, a la que en algunos rasgos se parece, pero que no tiene su olor y sabor dulzón característico (Fábregas, 2002).

Los dos criterios más importantes para los consumidores son la dureza y el color. La carne de caballo se caracteriza por su terneza (< 5N) (Sarriés & Beriain, 2006). Lo que determina la terneza de la carne es la parte insoluble del tejido muscular: tejido conjuntivo, las proteínas fibrilares y las fibras musculares.

El color es una característica muy importante, ya que en el caso de la carne de caballo se oscurece rápidamente debido a que es rica en mioglobina y tiene una alta capacidad de combinación con el oxígeno, por lo tanto se acelera la oxidación de la oximioglobina de color rojo brillante a metamioglobina de color marrón. Estas circunstancias reducen la estabilidad del color rojo de la carne de caballo fresca, acortando su vida útil (Badiani & Manfredini, 1994). Los resultados obtenidos por Sarriés et al. (2014) indicaron que el contenido de mioglobina en la carne de potro es mayor de 5 mg/g músculo. Por otro lado, el contenido de pigmentos aumenta con la edad, permitiendo diferenciar la carne de potro con la de caballo, debido a que varía del rosado claro en los lechales al rojo – azulado oscuro en los animales adultos.

Otro de los criterios de calidad organoléptica es la grasa, el color de la grasa de la canal variará según la cantidad de hierba o forraje que haya consumido el animal. Así, un potro criado mayoritariamente con leche presentará una canal con buen estado de engrasamiento y grasa de color crema. El mismo potro criado con menos leche habrá

tenido que ayudarse comiendo hierba; la canal será entonces más magra, la coloración de la grasa más amarillenta y la de la carne rosada oscura (Fábregas, 2002).

1.1.4 Sistema de producción de carne de caballo

En cuanto a los sistemas de producción se pueden diferenciar: sistemas extensivos e intensivos.

El sistema extensivo predomina en las montañas del norte de España, aunque también se dan casos en las zonas con dehesa. En ambos casos se basan en el pastoreo permanente, con alimentación suplementaria cuando es necesario. Respecto a los extensivos de montaña, existen dos modelos. Uno serían caballos que viven semisalvajes, alimentándose exclusivamente de los recursos que encuentran en su hábitat, caso de los caballos autóctonos de Asturias, Cantabria y Galicia. Por otro lado, en País Vasco y Navarra las yeguas de tipo semipesado, viven en completa libertad, y en épocas de inviernos duros son recogidas durante los días que no pueden pastar. El ganado asciende a las distintas zonas de montaña cuando el crecimiento de los pastos es el adecuado para el consumo, y descienden cuando el mal tiempo no permite prolongar más su permanencia en los pastos (Ministerio de Agricultura, 2002). La época de partos coincide con la primavera (marzo-abril) y los potros lechales acompañan en primavera verano a sus madres a los pastos de altitud. Hacia octubre, los animales bajan de la montaña, destetándose los potros lechales para su venta en las ferias que tienen lugar durante otoño, donde se comercializan animales para vida (reproducción y trabajo), engorde y sacrificio (Fábregas, 2002). En Navarra, la comercialización está mayoritariamente dominada por potros de la raza Burguete, criados en un sistema tradicional extensivo (Sarriés, 2005).

Las explotaciones intensivas son los cebaderos de potros, se dan generalmente en la zona oriental de España, bien en estabulación permanente o en estabulación libre (Ministerio de Agricultura, 2002).

En el estudio realizado por Franco (2011) sobre la calidad de la carne de potro Gallego de Monte en diferentes explotaciones (extensiva, intensiva y extensiva de acabado) muestra que el tipo de explotación afecta muy significativamente al contenido de humedad, proteína e índice de rojo, y de manera menos significativa al contenido de Fe-hemo e índice de amarillo.

El sistema de producción ganadero de potros también puede diferenciarse a partir de la edad de sacrificio, en este caso se diferencian dos sistemas, que no están bien definidos, puesto que la carne de potro depende de la demanda del mercado. La mayoría de los potros Burguete (80%) a la edad de 6-7 meses, se venden generalmente como "potros lechales" a los comerciantes en el mercado de ganado. Por lo tanto, estos animales son acabados con concentrados durante 7-8 meses para la consumición de su carne con 16-17 meses. El resto de los potros Burguete (20%) permanecen con su madre en el pasto hasta 16-17 meses de edad y luego también se venden como "potros quincenos" en

mercados de ganado, son alimentados con concentrados durante 7-8 meses y su carne es consumida con 24 meses de edad (Sarriés, 2005).

1.2 OXIDACIÓN PROTEICA

La oxidación proteica (OP) en tejidos vivos ha sido extensamente estudiada, juega un papel esencial en acontecimientos fisiológicos en sistemas biológicos, en particular, en el proceso de envejecimiento de las células (Stadtman, 2004). Por otro lado, ha sido sugerido que la oxidación de proteínas está unida al desarrollo de un amplio rango de enfermedades relacionadas con la edad. Sin embargo, en carne y en productos cárnicos, el inicio de la OP y sus consecuencias en la calidad del producto final está pobremente documentada (Lund, Heinonen, Baron, & Estevez, 2011).

La oxidación de macromoléculas en productos cárnicos conduce a cambios químicos irreversibles y a una gran pérdida de calidad, afectando a las propiedades sensoriales y nutricionales. Por lo tanto, **los procesos oxidativos se reconocen como los factores principales no microbiológicos implicados en la pérdida de calidad de la carne durante la manipulación *post-mortem*, almacenamiento y procesado** (Estevez et al., 2012).

En los alimentos, la OP no fue un tema de interés hasta mediados de los años noventa. Hasta entonces, la oxidación lipídica había concentrado todo el interés científico e industrial debido al conocido impacto de este fenómeno sobre la calidad de la carne y otros alimentos. En este tiempo se ignoraba que las proteínas pudieran ser también susceptibles a dichas reacciones de oxidación.

La OP es responsable de la aparición de texturas anómalas en carne fresca y en sus derivados. Las proteínas oxidadas ven mermadas sus propiedades funcionales. Por otro lado, la OP provoca la pérdida irreversible de aminoácidos esenciales y la alteración de la digestibilidad de las proteínas oxidadas lo que conduce a una merma del valor nutritivo de la carne (Estevez et al., 2012).

1.2.1 Mecanismos químicos y factores

1.2.1.1 Oxidación proteica: mecanismos generales

Numerosas especies reactivas de oxígeno tales como los radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el hidropéroxido ($HO_2^{\cdot-}$) e hidroxilo (HO^{\cdot}) y otras especies no radicales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) e hidroperóxido ($ROOH$) han sido reconocidos como potenciales iniciadores de la OP. Los componentes naturales del tejido muscular **como los lípidos insaturados, pigmentos hemo, metales de transición y enzimas oxidativos** son los potenciales propulsores o catalizadores de la formación de especies reactivas de oxígeno y por lo tanto, desempeñan un papel relevante en la iniciación de la OP del músculo. El esqueleto peptídico y los grupos funcionales localizados en la cadena lateral de aminoácidos residuales son objetivos comunes de las especies reactivas de oxígeno. En la Figura 4 se muestra el conjunto de reacciones que tienen lugar en la formación de

especies reactivas de oxígeno. Como consecuencia directa de la abstracción de un átomo de hidrógeno como un objetivo susceptible (PH), se forma un radical proteico carbono-centrado ($P\cdot$) (Reacción 1) (Stadtman & Levine, 2003). El radical carbono-centrado inicial ($P\cdot$) en presencia de oxígeno es convertido consecutivamente en un radical peróxido ($POO\cdot$) y en un peróxido de alquilo ($POOH$) por abstracción de un átomo de hidrógeno de otra molécula susceptible (Reacción 2 y 3). Otras reacciones con especies reactivas de oxígeno, tales como el radical hidropéroxido ($HO_2\cdot$) o formas reductoras de metales de transición (M^{n+}) conducen a la formación de un radical alcoxi ($PO\cdot$) (Reacciones 4 y 5) y su derivado hidroxilo (POH) (reacciones 6 y 7) de la siguiente manera:

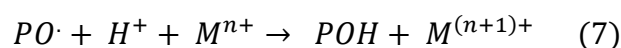
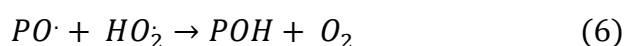
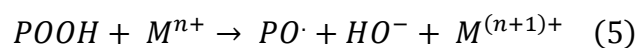
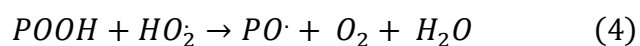
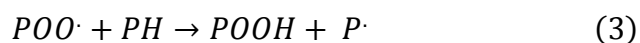
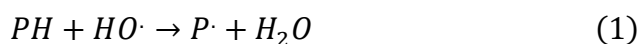


Figura 4. Reacciones formación de radicales libres (Estévez, 2011)

La modificación oxidativa de las cadenas laterales de aminoácidos, la conversión de un aminoácido en uno diferente, la fragmentación de la cadena peptídica y la formación de enlaces cruzados intra e inter moleculares son consecuencias comunes de la oxidación de proteínas mediante agentes oxidantes (Stadtman & Levine, 2000). Además de la susceptibilidad de particulares aminoácidos a someterse a reacciones oxidativas, su posición dentro de la estructura de la proteína afecta en gran medida a su exposición a promotores de la oxidación y por lo tanto, su degradación oxidativa (Estévez, 2011).

Ciertos aminoácidos como la cisteína y la metionina se oxidan en primer lugar, en condiciones de oxidación suaves (baja concentración de agentes oxidantes), debido a la alta susceptibilidad de los centros de azufre. Los residuos de triptófano también se oxidan rápidamente en presencia de metales de transición, este fenómeno se considera como una manifestación de oxidación de proteínas temprana (Estévez, Kylli, Puolanne, Kivikari, & Heinonen, 2008). Curiosamente, la oxidación temprana y preferencial de ciertos aminoácidos como la metionina implicaría la llamada “protección sacrificial”, por la cual ciertos aminoácidos con potencial antioxidante y un papel insignificante en la funcionalidad de la proteína recoja el agente antioxidante (Levine, Berlett, Moskovitz, Mosoni, & Stadtman, 1999). En condiciones de intensa oxidación se generan grandes cantidades de carbonilos proteicos (CP). La formación de carbonilos principalmente deriva de la oxidación de treonina, prolina, arginina y lisina.

1.2.1.2 Carbonilación proteica como expresión de la oxidación proteica

La carbonilación es una modificación irreversible y no enzimática de proteínas que implica la formación de restos de carbonilos inducidos por el estrés oxidativo y otros mecanismos (Berlett & Stadtman, 1997). Los carbonilos (aldehídos y cetonas) se forman en las proteínas a partir de la oxidación directa de las cadenas laterales de los aminoácidos (Requena, Chao, Levine, & Stadtman, 2001). En la Figura 5 se muestra la formación de un carbonilo a partir de la cadena lateral de un residuo de lisina. Según Estévez (2009) este es el mecanismo que se ha demostrado que produce carbonilos en las proteínas de la carne.

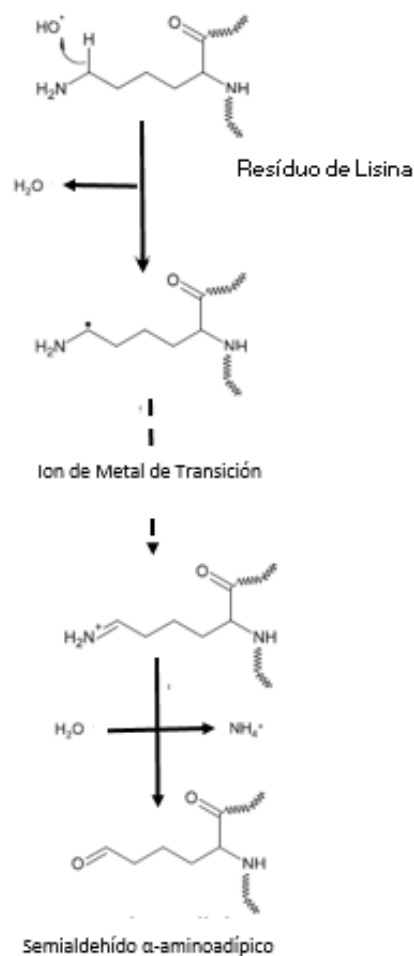


Figura 5. Formación de carbonilos en proteínas cárnicas (Estévez, 2011)

La formación de carbonilos derivados de las cadenas laterales de lisina, treonina, arginina y prolina es normalmente atribuida a los sistemas de oxidación catalizados por metales (Stadtman & Levine, 2003). De acuerdo con este mecanismo, por ejemplo el hierro ferroso (Fe^{2+}) favorece la descomposición del H_2O_2 a radicales hidroxilo (HO^\bullet) según la reacción de Fenton (Figura 6). Este radical hidroxilo es muy reactivo y genera

rápidamente radicales libres, sustrayendo átomos de hidrógeno de los aminoácidos de las cadenas laterales, este fenómeno puede observarse en la figura 5.

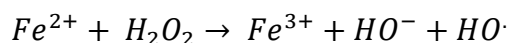


Figura 6. Reacción de Fenton (Miller, 2010)

La presencia de sitios de unión de metales en las proteínas explica que los residuos de aminoácidos situados en estos lugares sean especialmente susceptibles a la oxidación catalizada por metales (Stadtman & Levine, 2003). En este sentido, algunos autores consideran que la oxidación catalizada por metales está limitada a estos sitios de unión de metales en las proteínas en condiciones suaves de oxidación, mientras que prácticamente todos los residuos de aminoácidos se verían afectados a altas concentraciones de H_2O_2 e iones metálicos como el Fe^{2+} .

Como consecuencia de la oxidación catalizada por metales, los aminoácidos sufren diversas modificaciones, estas se pueden observar en la Figura 7, destaca la lisina que se convierte en semialdehído α -aminoadípico (AAS), y arginina y prolina en semialdehído γ -glutámico (GGS). AAS y SGG se propusieron originalmente como biomarcadores de daño oxidativo a las proteínas por Daneshvar, Frandsen, Autrup, & Dragsted (1997). Poco después, ambos semialdehídos destacaron como los principales carbonilos producto de la oxidación de proteínas catalizada por metales. Ambos aldehídos representan alrededor del 70% de la cantidad total de CP formados en las proteínas animales oxidadas (Akagawa et al., 2006; Lund et al., 2011).

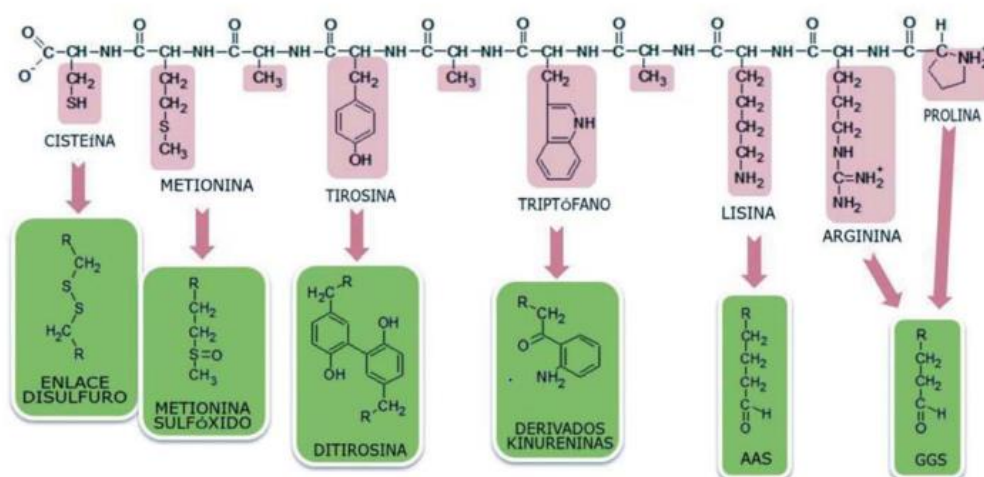


Figura 7. Modificación de las cadenas laterales de aminoácidos como consecuencia de las reacciones de oxidación (Estevez et al., 2012).

De acuerdo con la vía de formación descrita a fondo por Akagawa et al. (2006) las cadenas laterales de los aminoácidos susceptibles son desaminadas oxidativamente en presencia de metales de transición tales como el hierro y el cobre (Figura 8). Las especies reactivas de oxígeno atacarían el grupo amino de la cadena lateral del aminoácido mediante la abstracción de un átomo de hidrógeno del carbono vecino, dando lugar a la formación de un radical de proteína de carbono centrado (P^\cdot). En una

etapa adicional, las formas oxidadas de los iones de metal aceptarían el electrón solitario del carbono radical para formar un grupo amino que es espontáneamente hidrolizado para dar el resto aldehído correspondiente (Akagawa et al., 2006).

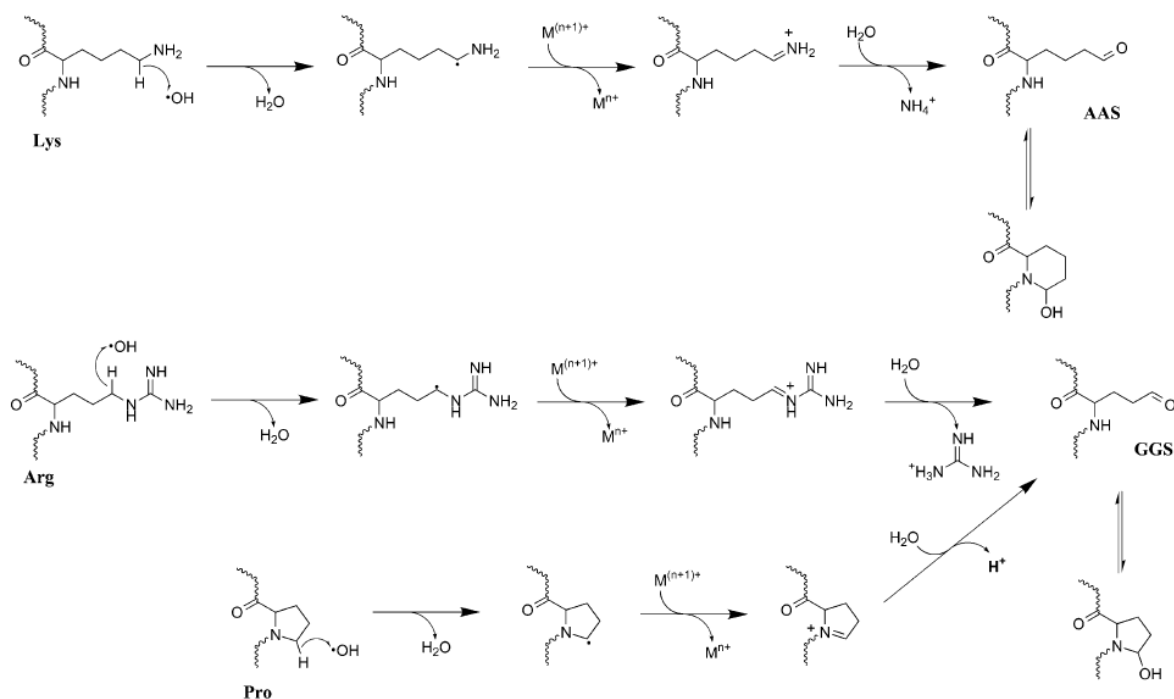


Figura 8. Vía de formación de carbonilos de proteínas específicas, semialdehídos α -aminoadípico y γ -glutámico, (AAS y GGS, respectivamente) (M. Akagawa et al., 2006)

1.2.1.3 Carbonilación de proteínas cárnicas: mecanismos específicos

Las proteínas de la carne son susceptibles a las reacciones de oxidación, estas las dirigen a la formación de carbonilos. La carbonilación de las proteínas de la carne puede ser inducida in vitro usando sistemas de generación de agentes oxidantes, incluyendo oxidación catalizada por metales, la oxidación mediada por la mioglobina y los sistemas de oxidación lipídica.

Rol de los sistemas de oxidación catalizados por metales

Se ha demostrado que la combinación de metales de transición con H_2O_2 tiene un efecto pro-oxidante eficaz en la carne. Decker et al. (1993) encontraron que una combinación de iones metálicos ($\text{Fe}^{3+}/\text{Cu}^{2+}$) con ácido ascórbico era efectiva en la inducción de la formación de carbonilos in vitro, oxidando proteínas miofibrilares. Los resultados indicaron que la adición de H_2O_2 no era requerida, los metales de transición podrían generar especies reactivas de oxígeno. El ácido ascórbico crea un “ciclo-redox” mediante la reducción de la forma oxidada del ion metálico, lo que a su vez genera la formación de agentes oxidantes de oxígeno y/o H_2O_2 (Kanner, Hazan, & Doll, 1988).

Los mismos autores encontraron que Fe^{3+} resultaba más efectivo que Cu^{2+} en la promoción de la carbonilación proteica. Decker y Xiong (1995) informaron que el aumento significativo de carbonilos en las proteínas musculares incubadas con Fe^{2+} /ascorbato coincidió con una pérdida de grupos $\epsilon\text{-NH}_3$, que hace hincapié en la desaminación oxidativa de las cadenas laterales de aminoácidos como la ruta principal para la formación de restos carbonilo en proteínas de la carne.

Rol de la mioglobina

Además de los metales de transición, se ha comprobado que otros componentes naturales del músculo como la mioglobina promueven la OP. Estudios muestran que la metamioglobina promueve la formación de carbonilos de proteínas miofibrilares en mayor grado que un sistema oxidante catalizado por metales (Fe^{3+} /ácido ascórbico/ H_2O_2). Xiong y Park (2007) demostraron que la metamioglobina resultaba más efectiva que el sistema oxidante catalizado por el hierro en la degradación individual de aminoácidos, como por ejemplo en la lisina. En presencia de H_2O_2 , la mioglobina forma especies hipervalentes (tienen más de ocho electrones en su capa de valencia) como la ferrimioglobina que se emplea como iniciador de la oxidación de lípidos y proteínas (Baron & Andersen, 2002).

Rol de la oxidación lipídica

Las especies reactivas de oxígeno derivadas de lípidos, tales como los radicales peroxilo ($\text{ROO}\cdot$) son también posibles iniciadores de carbonilación proteica. De acuerdo con Park, Xiong, Alderton, & Oozumi (2006) la incubación de proteínas miofibrilares con ácido linoleico y lipooxidasa conduce a varios cambios bioquímicos incluyendo la formación de carbonilos. Los mismos autores observaron un acoplamiento de los procesos de oxidación lipídica y proteica durante la oxidación in vitro de proteínas miofibrilares por los sistemas catalizados con metales y lípidos oxidados. Considerando que la carbonilación de proteínas puede tener lugar en ausencia de lípidos (Stadtman & Oliver, 1991), la aparición simultánea de la oxidación lipídica y proteica en sistemas de carne sugiere una posible interacción entre ambos fenómenos (Estévez et al., 2008; Park et al., 2006). Estas interacciones pueden implicar la transferencia recíproca de las especies reactivas y no reactivas entre los lípidos y las proteínas. Como se ha mencionado anteriormente, la degradación temprana de los grupos que contienen azufre de las proteínas miofibrilares podría ser considerado como un mecanismo de protección contra los agentes oxidantes endógenos (Saigas, Tanabe, & Nishimura, 2003). Proteínas y lípidos podrían beneficiarse de esta defensa antioxidante. De hecho, Estévez et al. (2008) observaron un papel protector de las proteínas miofibrilares contra la oxidación de lípidos en emulsiones de aceite en agua. Cuando el estrés oxidativo excedía la capacidad antioxidante de las proteínas, tanto los lípidos como las proteínas sufrían daño oxidativo manifestándose con reacciones en cadena de radicales libres. Una vez que han comenzado las reacciones de oxidación, los cambios apreciables indican que la oxidación lipídica progresa más rápidamente que la proteica. Debido a esto, los

radicales e hidroperóxidos formados a partir de los lípidos insaturados pueden atacar a las cadenas de aminoácidos susceptibles y producir carbonilos.

Otros factores

Además de la presencia de metales de transición, mioglobina y de la oxidación lipídica, la oxidación de proteínas está afectada por numerosos factores ambientales, como el pH, temperatura, actividad de agua y la presencia de otros promotores y/o inhibidores como los compuestos fenólicos (Xiong et al., 2007).

1.2.2 Evaluación de la carbonilación de proteínas

Para conocer el contenido total de carbonilos se emplea el método DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina), un procedimiento rutinario que permite la cuantificación de la cantidad total de CP de una muestra. Los resultados se usan ampliamente como un índice de OP en la carne y productos cárnicos (Lund et al., 2011). El método se basa en la reacción entre el DNPH con los CP para formar hidrazona 2,4-dinitrofenilo (DNP), que muestra un pico máximo de absorbancia a alrededor de 370 nm (Oliver et al., 1987). Este método carece de especificidad, no sirve para identificar la naturaleza de los productos de oxidación, ya que no reacciona sólo con los grupos carbonilos de las proteínas sino que también puede reaccionar con los grupos carbonilos de los lípidos, dando lugar a una sobreestimación en la concentración total de carbonilos procedentes de proteínas. Debido a esto, una deducción precisa de los mecanismos y rutas de OP, no es factible mediante el método DNPH (Armenteros et al., 2009).

Poco después de descubrir los semialdheídos α -aminoalifático y γ -glutámico (AAS y SGG) se destacaron como biomarcadores específicos del daño oxidativo en las proteínas, como resultado se han desarrollado métodos para detectar y cuantificar de forma precisa ambos semialdheídos. AAS y SGG son sensibles a la hidrólisis ácida y por lo tanto, se requiere un procedimiento de derivación para la estabilización. Los CP son, además, altamente reactivos (Xiong, 2000) y por lo tanto, los procedimientos de derivatización, por lo general, implican la modificación de la fracción de carbonilo por reducción o aminación. Recientemente, Akagawa et al. (2006) propusieron un procedimiento alternativo para la detección de AAS y GGS que implica la aminación reductora de ambos semialdehidos en presencia de cianoborohidruro de sodio (NaCNBH_3) y ácido p-aminobenzoico (ABA). Este procedimiento proporciona algunas ventajas como que los semialdehidos derivatizados de ABA muestran una gran estabilidad frente a la hidrólisis ácida y almacenamiento en frío (Akagawa, Sasaki, Kurota, & Suyama, 2005). Tras el proceso de derivatización Estévez, Ollilainen, & Heinonen (2009) detectaron AAA y GGS en proteínas miofibrilares oxidadas mediante el uso de HPLC. Los autores describen un programa de HPLC simple y rápido para la separación de ABA y las formas derivatizadas de los semialdehidos antes de la cuantificación utilizando un detector de fluorescencia. El conocimiento de la naturaleza química exacta de los CP permite la comprensión de los mecanismos que conducen a su generación, la implicación potencial de los compuestos específicos en reacciones

adicionales y su potencial importancia en la biológica y los sistemas alimentarios (Estévez, 2011).

1.2.3 Reactividad de los carbonilos proteicos.

La detección de CP específicos (AAS y SGG) y la confirmación de su presencia en las proteínas alimentarias oxidadas (Daneshvar et al., 1997) permitieron la realización de estudios dedicados específicamente a su reactividad en sistemas alimentarios. La formación de AAS y GGS en sistemas cárnicos mostraban un aumento inicial (como resultado de la oxidación catalizada por metales de proteínas miofibrilares in vitro) seguido de una disminución significativa de ambos compuestos. Los autores plantearon la hipótesis de si la pérdida neta aparente de CP en las tasas de oxidación prolongada puede ser causada por la implicación de tales compuestos como sustancias reaccionantes en reacciones avanzadas (Estévez, 2011).

Por lo tanto, el resto aldehído de carbonilos específicos puede estar involucrado en varias reacciones, i) una degradación oxidativa más, por la que el resto aldehído se oxida en un ácido carboxílico (Sell, Strauch, Shen, & Monnier, 2008), ii) la reacción con un aldehído de otro carbonilo para formar un producto de condensación aldólica (Dolz & Heidemann, 1989), iii) la reacción con un grupo amino de un aminoácido de una proteína vecina (principalmente lisina) para formar un enlace covalente a través de la formación de una base Schiff (grupo funcional que contiene un enlace doble carbono-nitrógeno) (Dolz & Heidemann, 1989), iv) y la reacción con un grupo α -amino de un aminoácido libre para formar un aldehído de Strecker a través de la degradación de tipo Strecker (desaminación oxidativa y descarboxilación del aminoácido en presencia de un compuesto de carbonilo), los aldehídos de Strecker son compuestos volátiles comunes y contribuyen al aroma de los alimentos así como de la carne (Estévez, 2011). Todas estas reacciones pueden observarse en la figura 9.

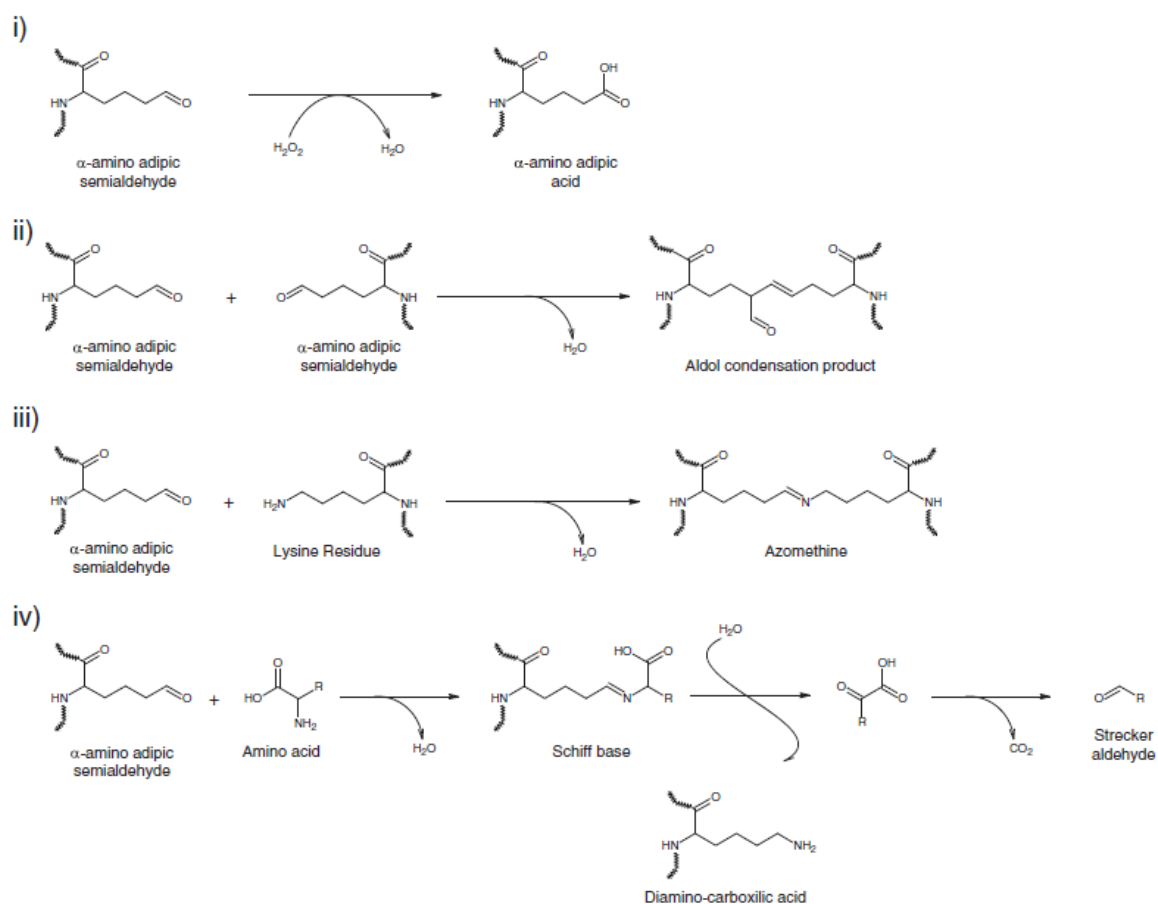


Figura 9. Implicación en reacciones posteriores de un carbonilo específico (AAS) (Estévez, 2011)

1.2.4 Carbonilación de proteínas en la carne

Después del sacrificio, los mecanismos antioxidantes *in vivo* se colapsan parcialmente mientras que van sucediendo los cambios bioquímicos durante la conversión del músculo en carne, favoreciendo la oxidación (Morrissey, Sheehy, Galvin, Kerry, & Buckley, 1998). La disminución de pH 7,0 a 5,5 y el posterior almacenamiento a 0°C se ha demostrado que incrementa la oxidación de las proteínas miofibrilares (Srinivasan, Xiong, & Decker, 1996). Se cree que altas concentraciones de H^+ (bajo pH) favorecen el ciclo redox de la mioglobina (oxidación de oximioglobina a metamioglobina) y por lo tanto, su potencial prooxidante (Estévez, 2011). Otros efectos a los que conducen una bajada de pH son la agregación, la desnaturalización y la disminución de la solubilidad de las proteínas musculares, que podría afectar a su susceptibilidad a la oxidación.

A parte de la bajada del pH, otros cambios bioquímicos *post-mortem* como la alteración de la estructura celular, la oxidación de enzimas y la propagación de la oxidación lipídica probablemente promuevan la formación de CP en la carne *post-rigor* (Estévez, 2011).

Numerosos estudios confirman la aparición de CP durante el almacenamiento en frío. Los datos de CP reportados en estos estudios en los cuales se han empleado muestras similares de carne y la misma técnica (método DNPH) muestran gran variabilidad. La falta de fiabilidad entre los resultados de los estudios hace destacar la dificultad de aplicar sistemáticamente el método DNHP. Sin embargo, diferentes trabajos han mostrado que la propagación de los CP dependen altamente del origen de la carne, el tipo de músculo, la especie y las condiciones de almacenamiento (Estévez, 2011).

Recientes estudios han demostrado que, durante el almacenamiento congelado de la carne, las proteínas cárnicas también se someten a carbonilación (Estévez, Ventanas, Heinonen, & Puolanne, 2011). Soyer (2010) informó de un aumento significativo de la cantidad total de CP después de 6 meses de almacenamiento en congelación a -18°C . Mediante el análisis de CP específicos, Estévez et al. (2011) encontraron un aumento significativo de AAS y GGS durante los primeros 2 meses de congelación a -18°C , mientras que al final de la congelación (4 meses) se detectó una disminución significativa. Según los autores, estos resultados sugieren que el AAS y SGG pueden estar implicados en reacciones posteriores. La carbonilación de proteínas de la carne durante la congelación parece estar relacionada con la aparición de reacciones oxidativas en lípidos y se ve afectada por el tipo de músculo (Estévez et al., 2011), temperatura de congelación (Soyer et al., 2010), las condiciones de envasado y operaciones anteriores, tales como pre-picado (Estévez et al., 2011).

Por otro lado, el almacenamiento durante la congelación hace que algunos productos cárnicos tengan mayor susceptibilidad de sufrir más reacciones de oxidación durante el procesado posterior (Utrera, Morcuende, & Estévez, 2014). En el estudio realizado por Estévez (2011) indica que el almacenamiento en congelación de la carne tiene un impacto significativo sobre la capacidad de la carne de retener agua y grasa. Esta pérdida de retención de agua puede influir sobre otros procesos tecnológicos como la irrigación en salmuera, el marinado y el posterior cocinado de la carne (Liu, Xiong, & Chen, 2010).

Además, numerosos procesos tecnológicos tienen un efecto negativo en la carbonilación de las proteínas cárnicas, como la irradiación, el cocinado, la maduración, la fermentación y las altas presiones hidrostáticas (Estévez, 2011).

1.2.5 Impacto de la carbonilación proteica en la calidad de la carne

La oxidación proteica (OP) causa múltiples cambios físico-químicos en proteínas, incluyendo la destrucción de aminoácidos, la disminución de solubilidad de las proteínas, la pérdida de la actividad enzimática y alteración de digestibilidad de las proteínas (Xiong, 2000). Teniendo en cuenta estas modificaciones, parece razonable plantear que la OP de la carne podría afectar a su calidad. La aparición de la OP en los sistemas musculares fue inicialmente relacionada con la pérdida de funcionalidad de la proteína incluyendo alteraciones en la solubilidad, viscosidad, gelificación, emulsificación, y capacidad de retención de agua. Lund et al. (2011) en una revisión

informaron de que la OP presenta también efectos nocivos sobre los rasgos de textura y valor nutritivo.

1.2.5.1 Impacto sobre la funcionalidad de las proteínas cárnicas

La oxidación de las proteínas cárnicas está claramente asociada con la pérdida de la funcionalidad. Las propiedades funcionales de las proteínas miofibrilares resultan de vital importancia en la tecnología de la carne, de ellas depende el éxito de la transformación de la carne como materia prima en diversos productos (Estevez et al., 2012). Según las investigaciones de Xiong (2000), una OP severa se caracteriza por una formación masiva de carbonilos, que provoca en las proteínas la pérdida de la capacidad para formar geles, emulsiones, espumas, etc.

1.2.5.2 Impacto sobre el valor nutritivo

En relación al valor nutritivo de la carne es importante destacar que determinados cambios inducidos por la OP implican pérdida irreversible de aminoácidos esenciales. Además, las proteínas oxidadas se digieren con mayor dificultad que las intactas. De acuerdo con la investigaciones llevadas a cabo por Santé-Lhoutellier, Aubry, & Gatellier (2007), los procesos de oxidación pueden afectar a los sitios específicos que los enzimas digestivos reconocen en las proteínas cárnicas y donde ejercen su acción digestiva. Estas proteínas oxidadas pasarían sin digerirse al intestino donde sufren fermentaciones, generándose compuestos tóxicos que podrían estar relacionados con enfermedades graves como cáncer de colon (Evenepoel et al., 1998).

1.2.5.3 Impacto sobre las características sensoriales

En relación a los atributos sensoriales, existen evidencias científicas de la influencia negativa de la OP sobre la terneza, el proceso de tenderización de la carne tiene lugar durante el *rigor-mortis*, depende de la actuación de enzimas proteolíticas sobre las proteínas miofibrilares. La influencia de la OP sobre la terneza se explica por la inactivación de las enzimas proteolíticas debido a su oxidación. Por otro lado, la ausencia de degradación de las proteínas miofibrilares durante la maduración podría deberse a la oxidación del sustrato de las enzimas, las propias proteínas miofibrilares (Huff-Lonergan & Lonergan, 2005) que al modificarse como consecuencia de la oxidación no son reconocidas por las enzimas. Ya sea por modificación de oxidativa de las enzimas o del sustrato, el fallo en el proceso de tenderización por disminución de la actividad proteolítica, explica qué carnes con elevados niveles de OP durante su maduración presenten una textura más firme (Estevez et al., 2012).

Varios estudios han asociado los niveles de oxidación a la dureza. Es el caso de los trabajos publicados por Estévez, Ventanas, & Cava (2005) en salchichas, Estévez & Cava (2004) en patés, Fuentes, Ventanas, Morcuende, Estévez, & Ventanas (2010) en jamón curado y Ganhão, Morcuende, & Estévez (2010) en hamburguesas de cerdo. En todos los casos, la carbonilación de las proteínas cárnicas presentó correlaciones positivas y significativas con la dureza del producto.

1.2.6 Estrategias para proteger las proteicas cárnicas del deterioro oxidativo

La confirmación del impacto negativo de la OP sobre la calidad de la carne acelera la necesidad de desarrollar estrategias antioxidantes para frenarla. Estas estrategias se dividen principalmente en dos grupos: las estrategias *ante-mortem* o estrategias nutricionales que se aplican a través de la alimentación; y estrategias *post-mortem* o tecnológicas que se aplican directamente sobre el alimento.

Se ha demostrado que la estabilidad de la carne puede mejorarse mediante un manejo adecuado de la dieta de los animales (Decker, Faustman, & Lopez-Bote, 2000). La suplementación de la dieta con determinados antioxidantes como los tocoferoles y los carotenoides es efectiva para inhibir la carbonilación de la carne, mientras que la composición en ácidos grasos parece no tener efecto. El efecto protector de los tocoferoles sobre las proteínas cárnicas podría extenderse más allá de la refrigeración de la carne y perdurar durante el procesado (Estévez, Parra, Villaverde, & Utrera, 2012).

Por otro lado, la OP puede controlarse de forma directa en la carne mediante dos procedimientos: la utilización de estrategias de envasado y la aplicación de aditivos con actividad antioxidante frente a la OP. En cuanto al envasado, el envase a vacío resulta efectivo para proteger las proteínas cárnicas del daño oxidativo (Filgueras et al., 2010). Por otro lado, en atmósferas ricas en oxígeno, los niveles de OP se incrementan a medida que aumentan los niveles de oxígeno (Lorenzo & Gómez, 2012). En relación a la aplicación de sustancias antioxidantes, los compuestos fenólicos procedentes de vegetales despiertan un creciente interés debido a su efecto natural y sus diversos efectos bioactivos (Estévez et al., 2012).

2 OBJETIVOS

El objetivo principal que se pretende alcanzar en el presente trabajo es determinar cómo afecta tiempo de conservación en los parámetros indicadores del deterioro oxidativo proteico, mediante el empleo de muestras de carne de potro conservadas a vacío durante los días 0 (24 horas *postmortem*), día 4, 8, 12, 15 y 18 de conservación (TC0, TC4, TC8, TC12, TC15, TC18, respectivamente).

El objetivo específico fue conocer si el sexo de los animales empleados afecta a los resultados obtenidos.

3 MATERIAL Y MÉTODO

3.1 MATERIAL ANIMAL

Para el presente estudio se han empleado doce potros (7 hebras y 5 machos) cruzados procedentes de la raza “Caballo de Monte Gallego” con “Burguete”, los animales se criaron en un duro clima de invierno.

La raza Caballo Gallego del Monte es el resultado de muchos años de cruce de una raza autóctona ligera con otras razas más pesadas, que los agricultores utilizan para mejorar la producción de carne.

Por otro lado, la raza Burguete es autóctona de Navarra, y se caracteriza por un gran tamaño y una orientación a la producción de carne, que muestra mejores rasgos conformacionales que las razas no seleccionadas (Sarriés, 2005).

Un grupo de yeguas de raza Caballo Gallego del Monte se cruzó con un semental Burguete. El apareamiento se llevó a cabo de forma natural en el campo. Las hembras alcanzaron un peso promedio de 380 kg y el semental pesaba 670 kg.

La mayoría de los nacimientos tuvieron lugar de abril a julio de 2013. Los animales se criaron con sus madres y se les permitió pastar libremente. Se destetaron a los 6-7 meses y después fueron alimentados en pastos en pastoreo rotativo; tanto en los campos sembrados como en los naturales, siendo pasto la parte principal de la dieta. La vegetación se compuso de semillas (*Lolium perenne* y *Trifolium repens*) y de campos naturales (*Agrostis spp.*, *Lotus corniculatus*, *Holcus lanatus*, *Bromus mollis*, *Pseudoarrenatherum longifolium*, etc).

El pasto se suplementó con 2 kg de pienso enriquecido al 5% de lino, por potro y día, durante 100 días antes de su sacrificio. El suministro de pienso fue incrementándose gradualmente, desde 300 g por potro por día hasta 2 kg. La adaptación de los potros al pienso se realizó de forma muy rápida y en tan solo diez días, cada animal consumía 2 kg de concentrado al día.

En la Tabla 3 se puede observar la composición del pienso (%), los compuestos analizados (%), y su composición en ácidos grasos.

Tabla 3. Composición del pienso (%), compuestos analizados (%) y composición de ácidos grasos (%).

Composición del pienso (%)	
Avena	46
Maíz	14,5
Cebada	13
Soja	9
Salvado	5
Lino extrusionado	5
Glicerol	4
Carbonato cálcico - CaCO_3	1
Fosfato dicalcico - CaHPO_4	0,5
Sal	0,5
Núcleo vitamínico	0,5
Salmocid	0,05
Compuestos analizados (%)	
Proteína bruta	13,1
Fibra bruta	7,3
Grasa bruta	5
Ceniza bruta	5
Lisina	0,6
Metionina	0,2
Calcio	0,8
Sodio	0,3
Fósforo	0,5
Magnesio	0,2
Composición de ácidos grasos (%)	
Ácido araquidónico C20:0	0,27
Ácido behénico C22:0	0,15
Ácido esteárico C18:0	2,36
Ácido lignocérico C24:0	0,17
Ácido linoleico C18:2	38,61
Ácido alfa-linolénico C18:3	8,61
Ácido mistérico C14:0	0,3
Ácido oleico C18:1	33,66
Ácido palmítico C16:0	14,38
Ácido palmitoleico C16:1	0,14

3.2 SACRIFICIO DE LOS ANIMALES

El sacrificio de los potros tuvo lugar después de primavera de 2015, en torno a los 26 meses de edad, y con un peso vivo promedio de 444 kg. Los animales fueron aturdidos por el método de la bala cautiva, de acuerdo con la normativa vigente de la UE (Directiva del Consejo de la Unión Europea 95/221EC). Después del sacrificio, las canales se enfriaron durante 24 horas en una habitación convencional a 2° C y un 98% de HR.

3.3 CONSERVACIÓN MUESTRAS

A las 24 horas *post-mortem*, se extrajo el músculo *longissimus dorsi* (figura 11) de la canal izquierda (figura 10) y se cortó en filetes de 2,5 cm (figura 12) de grosor para ser conservados en refrigeración a 2 ° C durante varios días, correspondiéndose al día 0 (24 horas *post-mortem*), día 4, 8, 12, 15 y 18 de conservación (TC0, TC4, TC8, TC12, TC15, TC18, respectivamente). Las muestras de carne una vez cortadas se envasaron a vacío (99%, FRIMAQ V900, Lorca, España), una vez alcanzados esos tiempos, la carne se congeló a -20°C hasta el momento de su análisis.

De cada animal se obtuvo un filete para cada TC, alcanzando un total de 72 filetes (6 TC por 12 potros), los cuales se analizaron por duplicado.



Figura 10. Canal izquierda 24 horas *post-mortem*



Figura 11. Pieza dorsal donde se encuentra el músculo longissimus dorsi



Figura 12. Filete de 2,5 cm de grosor de longissimus dorsi

3.4 DETERMINACIÓN OXIDACIÓN PROTEICA

Los carbonilos proteicos, medidos como el contenido de carbonilos totales, se cuantificaron siguiendo el método descrito por Oliver et al. (1987), modificado por Vourela et al. (2005). En el presente estudio se modificó la velocidad de centrífuga de 5000 g a 10000 g y se hicieron dos lavados.

Las muestras de carne (2 g) se homogenizaron en 20 ml de 0,6 M NaCl durante 60 s usando el Ultra-Turrax (IKA T25 digital ULTRA-TURRAX). Se cogieron dos alícuotas del homogenizado (0,1 ml) y se transfirieron a viales Eppendorf. Las proteínas precipitaron con ácido tricloroacético (TCA) al 10% (1 ml), se agitó en el vortex (Vortex Mixers ZX3 Velp Scientifica) durante 30 s, se centrifugó durante 5 min a 10000g y se eliminó el sobrenadante. A un pelet (alícuota P) se le trató con 2 N HCl (1 mL) para cuantificar las proteínas y al otro (alícuota C) con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) al 0,2% en HCl 2 M (1 ml) para cuantificar los carbonilos. Las muestras se incubaron durante 1 hora en oscuridad y a temperatura ambiente, agitándose cada 20 minutos. Después se añadió TCA al 10% (0,8 ml) se agitó en el vortex durante 30 s, y se dejaron reposar durante 15 min, a una temperatura de 0-4° C. Se agitó en el vortex

durante 30 s y se centrifugó durante 5 min a 10000g y se eliminó el sobrenadante. El pelet se lavó dos veces con 1 mL de etanol-acetato de etilo (1:1 v/v) y se secó con N₂ gas. Finalmente, el pelet se disolvió con 1,5 mL de 20 mM fosfato sódico 6 M en buffer de hidrocloreuro de guanidina se agitó y se centrifugó durante 5 min a 10000 g, para que precipitaran los fragmentos insolubles.

El contenido de proteínas se calculó con la absorbancia a 280 nm (Espectrofotómetro UV/vis con detector de diodos, Shimadzu UV-2101PC) usando como estándar la albúmina de suero bovino (BSA) en 20 mM fosfato sódico 6 M en buffer de hidrocloreuro de guanidina. Las concentraciones de proteína se determinaron de acuerdo con una recta patrón, con concentraciones desde 1 a 2,5 mg/ml de BSA.

El contenido de carbonilos se expresó como nmol de carbonilos por miligramo de proteína usando un coeficiente de extinción de 21,0 mM⁻¹ cm⁻¹ a 370 nm.

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El estudio de los resultados se llevó a cabo mediante el paquete estadístico R Commander. Inicialmente se realizó un análisis descriptivo de los datos para conocer la información que estos nos aportan. Después, se contrastó la normalidad de los datos mediante un histograma, una gráfica de comparación de cuantiles y el test de normalidad de Shapiro-Wilk, también se estudió la homogeneidad de varianzas mediante el Test de Levene. Tras conocer la normalidad de los datos se llevó a cabo un análisis de inferencia estadística, en el cual se realizó un análisis de varianza (anova) usando el Modelo Lineal General para todos los factores considerados (sexo, TC y su interacción). Por último, se realizó un contraste de Tukey que consiste en una comparación de medias múltiples que permite agrupar niveles dentro de un factor (en este caso el factor es el tiempo de conservación).

La expresión del modelo lineal general es la siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + S_i + TC_j + (S \times TC)_{ij} + \epsilon_{ij}$$

donde:

Y_{ij} : valores de oxidación proteica para los diferentes tiempos de conservación y sexo.

μ : media de la población considerada.

S_i : efecto fijo debido al sexo de los animales ($i = 1$, Hembras; $i = 2$, Machos).

TC_j : efecto fijo debido al tiempo de conservación ($j = 1$ día 0; $j = 2$, día 4; $j = 3$, día 8; $j = 4$, día 12; $j = 5$, día 15; $j = 6$, día 18).

$S \times TC$: efecto fijo debido a la interacción sexo por tiempo de conservación.

ϵ_{ij} : error residual aleatorio.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se muestran los resultados obtenidos del análisis estadístico de los datos y se discuten los mismos.

4.1 EFECTO DEL SEXO Y DEL TIEMPO DE CONSERVACIÓN EN LOS CARBONILOS PROTEICOS

En la Tabla 4 se recogen los resultados del efecto del tiempo de conservación (TC), del sexo de los animales y la interacción entre ambos (TC x Sexo) sobre el contenido de carbonilos proteicos (CP).

Tabla 4. Nivel de significación de cada factor respecto al contenido de carbonilos proteicos en la carne de potro.

	TC	Sexo	TC x Sexo
Carbonilos proteicos (nmol/mg proteína)	P<0,001	P>0,05	P>0,05

TC=tiempo de conservación.

Como se puede observar en la Tabla 4, la interacción entre el TC y el sexo no es significativa ($p>0,05$), por lo tanto, el TC y el sexo fueron independientes, afectando de distinta forma al contenido de CP.

Respecto al estudio del efecto del sexo, el sexo de los animales no implicó diferencias significativas ($p>0,05$) respecto al contenido de CP (nmol/mg proteína). De los datos se desprende que el contenido en carbonilos para machos fue de $2,76 \pm 0,48$ y para hembras $2,60 \pm 0,64$. Hasta la fecha no existen trabajos que puedan discutir este resultado. No debería descartarse que en futuros trabajos, con un diseño experimental más equilibrado, el sexo pudiera afectar a la OP.

En lo que se refiere al TC, se observa que el TC afectó muy significativamente ($p<0,001$) al contenido de CP (nmol/mg proteína).

En la Figura 13 se representa gráficamente la evolución de los CP (nmol/mg proteína) con el transcurso del TC y como se puede observar en dicha figura, aunque el TC afectó muy significativamente al contenido de CP, no se observa una tendencia clara. En este sentido, se observa que los valores obtenidos de carbonilos a día 0 (TC0) fueron un 14 % más elevados que a TC4 y un 15 % que a TC8. A partir del TC8 en adelante, el nivel de CP aumentó en un 33 % hasta el TC15, siendo a TC15 el momento en el que se halla el máximo pico de carbonilos encontrados en el presente trabajo. Finalmente, el contenido de carbonilos hallados en TC18 descendió en un 8,3 % respecto al TC15. Los resultados hallados en este trabajo concuerdan con los hallados por Lorenzo & Gómez (2012). No debe olvidarse que el método empleado en el presente trabajo, DNPH, pudo dar a sobreestimaciones en la concentración total de carbonilos proteicos. Debido a esto,

una deducción precisa de los mecanismos y rutas de OP, no es factible mediante este método (Armenteros et al., 2009).

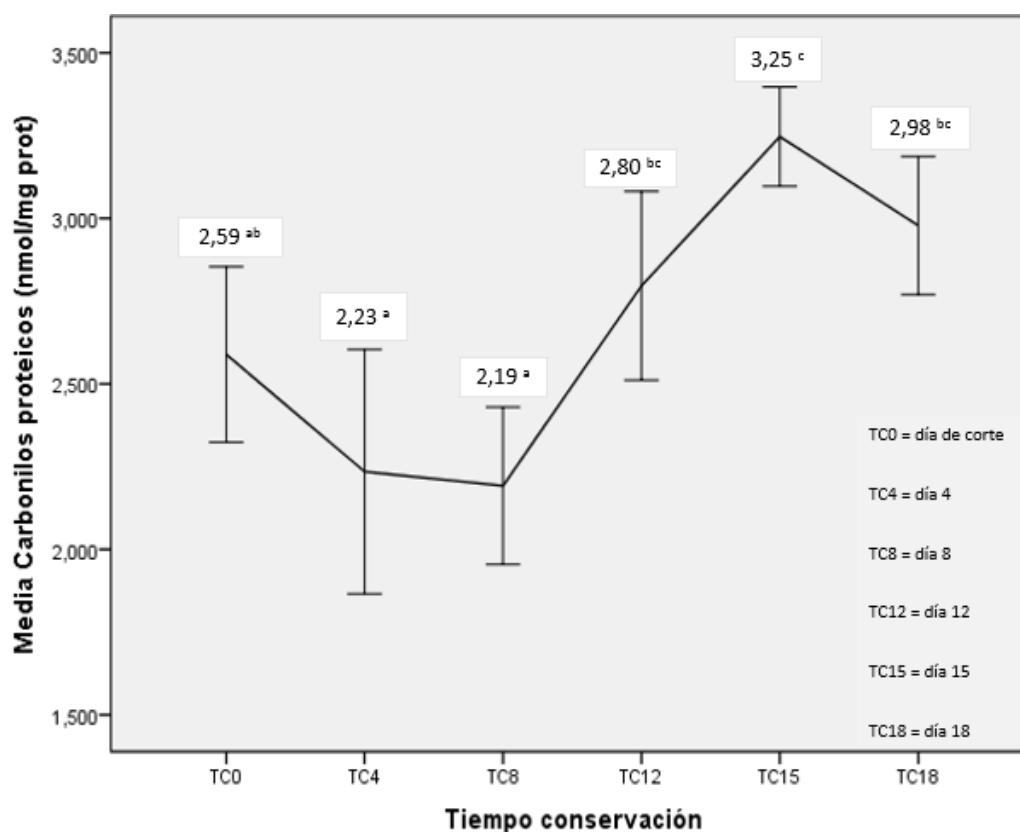


Figura 13. Evolución de los carbonilos proteicos a lo largo del tiempo de conservación. Gráfico de líneas con barras de error y medias de los distintos tiempos de conservación (TC).

Por otro lado, mediante el contraste Tukey se realizó una comparación de medias múltiples que permitió agrupar niveles dentro del factor TC, estos niveles pueden observarse en la Figura 13, las medias con letras diferentes son significativamente distintas ($p < 0,05$). En total el factor TC ha sido dividido en 3 grupos diferentes (medias con superíndices “a”, “b” y “c”). El grupo que se correspondió a las medias con superíndice “a” recayó en el contenido de carbonilos proteicos para los días de conservación TC0, TC4 y TC8 el cual alcanzó un valor medio de CP de 2,34 nmol/mg proteína. El grupo con superíndice “b” resultó como consecuencia de los valores similares de CP correspondientes a los días de conservación TC0, TC12 y TC18 cuyo valor medio fue de 2,79 nmol/mg proteína. Finalmente, el tercer grupo se correspondió a las medias con superíndice “c” procedente de los valores similares de CP alcanzados en los días de conservación TC12, TC15 y TC18 cuyo valor medio fue de 3,01 nmol/mg proteína. En el presente estudio, es de destacar que el valor de carbonilos encontrado en el TC0 es similar al hallado en el TC18. Estos resultados coinciden con los encontrados por Gómez & Lorenzo (2012) y Lorenzo & Gómez (2012), en donde se observa que no hay diferencias significativas entre el primer y el último TC. Esto puede deberse a que, en una tasa de oxidación prolongada, la pérdida neta aparente de CP puede ser causada por la implicación de estos como sustancias reaccionantes en otras reacciones (Estévez, 2011).

De acuerdo a Rowe, Maddock, Lonergan, & Huff-Lonergan, (2004) en un tejido muscular no oxidado, el contenido de carbonilos es de 1 nmol/mg proteína mientras que en tejido oxidado se han encontrado rangos de 2-14 nmol/mg proteína, estos valores dependen de muchos factores como: el iniciador de la oxidación, el tipo de músculo y la solubilidad de la proteína. En el presente trabajo, el contenido de CP fluctuó entre 1,44-3,88 nmoles/mg proteína. Al final del periodo de almacenamiento en el último TC (TC18), la media de CP fue de 2,95 nmol/mg proteína, esto indica que se ha producido un cierto grado oxidación proteica en los filetes de potro durante el transcurso de los distintos tiempos de conservación.

Además, según Sarriés (2014) la carne de potro es muy susceptible a ser deteriorada a medida que transcurre el TC. Dicho fenómeno se manifiesta como consecuencia de la oxidación lipídica, la oxidación de la mioglobina, la pérdida de luminosidad del color de la carne ocasionando un oscurecimiento y la pérdida de su color rojo característico, es decir, se produce la degradación de la carne de potro. Por lo tanto, en el presente estudio se desprende que el TC afecta a la OP la cual influye en la pérdida de la calidad de la carne de potro. Se podría decir que la OP es una consecuencia del TC.

Es importante mencionar que en el presente trabajo los potros fueron alimentados con un pienso enriquecido en semillas de lino, el cual es una fuente rica en ácidos grasos poliinsaturados y como consecuencia de ello, es posible que la carne de estos animales tuviera un perfil de ácidos grasos diferente a los potros alimentados con pienso comercial, afectando de distinta forma a los parámetros de OP.

Actualmente, es generalmente aceptado que la estabilidad oxidativa de la carne puede ser mejorada por medio de la dieta mediante el empleo de agentes antioxidativos (Estevez, 2015). La suplementación de piensos destinados para la alimentación de potros de aptitud cárnica, es una estrategia muy interesante a desarrollar como posible mecanismo de mejora en la calidad y estabilidad de la carne de potro.

Por último, es importante destacar que las muestras del presente trabajo, se encontraron envasadas a vacío. En un estudio previo Gómez & Lorenzo (2012) corroboraron que el envase a vacío reduce los procesos de oxidación e incrementa la estabilidad del color a lo largo del TC. Sin embargo, este tipo de envase conlleva que las muestras de carne de potro no presenten un aspecto agradable para el consumidor. En este sentido sería interesante realizar estudios para crear un envase que extendiera la vida útil de la carne de potro y tuviera un aspecto atractivo para el consumidor.

5 CONCLUSIONES

Con el material y el método empleado en el presente trabajo puede concluirse que:

1. El tiempo de conservación influye muy significativamente en los parámetros de oxidación proteica. Por lo tanto, el tiempo de conservación es un factor transcendental en la calidad de la carne de potro.
2. Como se ha podido observar, los carbonilos a lo largo del tiempo de conservación no siguen una tendencia ascendente clara, el aumento del tiempo de conservación en algunos casos no ha supuesto un incremento en el contenido de carbonilos proteicos. Esto puede deberse a que el resto aldehído de carbonilos específicos puede estar involucrado en varias reacciones como sustancias reaccionantes, ya que, los carbonilos proteicos son moléculas muy dinámicas.
3. El sexo no influye en los parámetros de oxidación proteica, aunque, como se desprende de los resultados, el contenido de carbonilos proteicos (nmol/mg proteína) es ligeramente superior en los machos. En este sentido se podría plantear un estudio en el que se incluyera el mismo número de machos que de hembras para que el diseño experimental fuera más equilibrado.
4. Resulta fundamental realizar nuevos estudios encaminados a extender la vida útil de la carne de potro. Estudiando conjuntamente el efecto de factores como el tiempo de conservación, el tipo de alimentación y el tipo de envase sobre los parámetros que influyen en la calidad de la carne de potro.

6 BIBLIOGRAFÍA

- Akagawa, K., Sasaki, D., Kurota, Y., & Suyama, K. (2005). Formation of α -aminoadipic and γ -glutamic semialdehydes in proteins by the Maillard reaction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1043, 129–134.
- Akagawa, M., Sasaki, D., Ishii, Y., Kurota, Y., Yotsu-yamashita, M., Uchida, K., & Suyama, K. (2006). New Method for the Quantitative Determination of Major Protein Carbonyls, α -Aminoadipic and γ -Glutamic Semialdehydes: Investigation of the Formation Mechanism and Chemical Nature in Vitro and in Vivo, (Figure 1), 1059–1065.
- Armenteros, M., Heinonen, M., Ollilainen, V., Toldrá, F., & Estévez, M. (2009). Analysis of protein carbonyls in meat products by using the DNPH method, fluorescence spectroscopy and liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (LC-ESI-MS). *Meat Science*, 83, 104–112.
- Badiani, A., & Manfredini, M. (1994). The production of horse meat. *Italian Journal of Animal Science*, 20, 5–43.
- Badiani, A., Nanni, N., Gatta, P. P., Tolomelli, B., & Manfredini, M. (1997). Nutrient Profile of Horsemeat 1, 269, 254–269.
- Baron, C. P., & Andersen, H. J. (2002). Myoglobin-induced lipid oxidation. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3887–3897.
- Belaunzaran, X., Bessa, R. J. B., Lavín, P., Mantecón, A. R., Kramer, J. K. G., & Aldai, N. (2015). Horse-meat for human consumption - Current research and future opportunities. *Meat Science*, 108, 74–81. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.05.006>
- Berlett, B. S., & Stadtman, E. R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 20313–20316.
- Daneshvar, B., Frandsen, H., Autrup, H., & Dragsted, L. O. (1997). γ -Glutamyl semialdehyde and 2-amino-adipic semialdehyde: Biomarkers of oxidative damage to proteins. *Biomarkers*, 2, 117–123.
- Decker, E. ., & Xiong, Y. . (1995). Alterations of muscle proteins functionality by oxidative and antioxidative processes. *Journal of Muscle Food*, 6, 139–160.
- Decker, E. ., Xiong, Y. ., Calvert, J. ., Crum, A. ., & Blanchard, S. . (1993). Chemical, physical, and functional properties of oxidized turkey white muscle myofibrillar proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 186–189.
- Decker, E., Faustman, C., & Lopez-Bote, C. (2000). *Antioxidants in muscle foods. Nutritional strategies to improve quality*. Wiley and Sons, Inc. New York.
- Dolz, R., & Heidemann, E. (1989). Reactivity of the allysine aldehyde group. Connective Tissue Research. *Connective Tissue Research*, 18, 255–268.
- Domínguez, R., & Lorenzo, J. M. (2015). El sexo influye en la composición de la carne ecológica de potro. *Alimentaria*, 460, 43–53.

- Estevez, M. (2015). Oxidative damage to poultry : from farm to fork. *Poultry Science*, 94, 1368–1378.
- Estévez, M. (2011). Protein carbonyls in meat systems: A review. *Meat Science*. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.04.025>
- Estévez, M., & Cava, R. (2004). Lipid and protein oxidation, release of iron from heme molecule and colour deterioration during refrigerated storage of liver pâté. *Meat Science*, 68, 551–558.
- Estévez, M., Kylli, P., Puolanne, E., Kivikari, R., & Heinonen, M. (2008). Fluorescence spectroscopy as a novel approach for the assessment of myofibrillar protein oxidation in oil-in-water emulsions. *Meat Science*, 80, 1290–1296.
- Estevez, M., Morcuende, D., Ventanas, S., & Ventanas, J. (2012). Oxidación de proteínas cárnicas (I): importancia científica y tecnológica. *Eurocarne*, 208(I), 56–65.
- Estévez, M., Ollilainen, V., & Heinonen, M. (2009). Analysis of protein oxidation markers – α -amino adipic and γ -glutamic semialdehydes – in food proteins by using LC–ESI multi- stage tandem MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 3901–3910.
- Estévez, M., Parra, V., Villaverde, A., & Utrera, M. (2012). Especial tecnología Oxidación de proteínas cárnicas (II): estrategias antioxidantes. *Eurocarne*, 212(2), 88–94.
- Estévez, M., Ventanas, S., & Cava, R. (2005). Protein oxidation in frankfurters with increasing levels of added rosemary essential oil: effect on colour and texture deterioration. *Journal of Food Science*, 70, 427–432.
- Estévez, M., Ventanas, S., Heinonen, M., & Puolanne, E. (2011). Protein carbonylation and water-holding capacity of pork subjected to freeze storage: effect of muscle type, premincing and packaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 5435–5443.
- Evenepoel, P., Claus, D., Geypens, B., Maes, B., Hiele, M., & Rutgeerts, P. (1998). Evidence for impaired assimilation and increased colonic fermentation of protein related to gastric acid suppression therapy. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 12, 10–11.
- Fábregas, X. (2002). Producción , calidad y consumo de carnes equinas en España. *Eurocarne*, 101, 1–5.
- FAO. (2014). Food and Agriculture Organizations of the United Nations. Retrieved from http://faostat3.fao.org/download/Q/*/E
- FAO. (2015). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Retrieved from (<http://faostat3.fao.org/home/index.html#DOWNLOAD>)
- FAO. (2016). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Retrieved May 29, 2016, from <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QL/E>
- Fernández de Labastida, I. (2011). *Caballos de monte y carne de potro. Análisis*

antropológico de un proceso contemporáneo de construcción identitaria, cultural y económica en la montaña Alvesa. Universidad del País Vasco.

- Filgueras, R. S., Gatellier, P., Aubry, L., Thomas, A., Bauchart, D., Durand, D., ... Santé-lhoutellier, V. (2010). Colour, lipid and protein stability of Rhea americana meat during air- and vacuum-packaged storage: Influence of muscle on oxidative processes. *Meat Science*, 86(3), 665–673. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.06.003>
- Franco, D., Fernández, M., Rodríguez, E., García, L., & Lorenzo, J. M. (2011). Calidad de la carne de potro gallego de monte en diferentes explotaciones. *Archivos de Zootecnia*, 60(231), 389–392.
- Fuentes, V., Ventanas, J., Morcuende, D., Estévez, M., & Ventanas, S. (2010). Lipid and protein oxidation and sensory properties of vacuum-packaged dry-cured ham subjected to high hydrostatic pressure. *Meat Science*, 85, 506–514.
- Ganhão, R., Morcuende, D., & Estévez, M. (2010). Tryptophan depletion and formation of α -amino adipic and γ -glutamic semialdehydes in porcine burger patties with added phenolic-rich fruit extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 3541–3548.
- Gómez, M., & Lorenzo, J. M. (2012). Effect of packaging conditions on shelf-life of fresh foal meat. *Meat Science*, 91(4), 513–20. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.03.007>
- Huff-Lonergan, E., & Lonergan, S. M. (2005). Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Science*, 71, 194–204.
- Kanner, J., Hazan, B., & Doll, L. (1988). Catalytic “free” iron ions in muscle foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, 412–415.
- Lawrie, R. A. (1998). *Lawrie's meat science* (6 th). Abington Hall, Abington, Cambridge.
- Levine, R. L., Berlett, B. S., Moskovitz, J., Mosoni, L., & Stadtman, E. R. (1999). Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mechanisms of Ageing and Development*, 107, 323–332.
- Liu, Z., Xiong, Y. L., & Chen, J. (2010). Protein oxidation enhances hydration but suppresses water-holding capacity in porcine longissimus muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 10697–10704.
- Lorenzo, J. M., & Gómez, M. (2012). Shelf life of fresh foal meat under MAP, overwrap and vacuum packaging conditions. *Meat Science*, 92(4), 610–618.
- Lorenzo, J. M., & Pateiro, M. (2013). Influence of type of muscles on nutritional value of foal meat. *Meat Science*, 93(3), 630–638. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.11.007>
- Lorenzo, J. M., Sarriés, M. V., Tateo, A., Polidori, P., Franco, D., & Lanza, M. (2013). Carcass characteristics, meat quality and nutritional value of horsemeat: a review. *Meat Science*, 96(4), 1478–88. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.12.006>

- Lund, M., Heinonen, M., Baron, C. P., & Estevez, M. (2011). Protein oxidation in muscle foods : A review, 83–95. <http://doi.org/10.1002/mnfr.201000453>
- Miller, D. (2010). Minerales. In S. Damodaran, K. Parkin, & O. Fennema (Eds.), *Fennema Quimica de los alimentos* (3rd ed., p. 563). Zaragoza: Acriba.
- Ministerio de Agricultura, P. y A. (2002). Cap.20.Sector Equino. In *El Libro Blanco de la Agricultura y el Desarrollo Rural*. Madrid.
- Morrissey, P. A., Sheehy, P. J. A., Galvin, K., Kerry, J. P., & Buckley, D. J. (1998). Lipid stability in meat and meat products. *Meat Science*, 49, S73–S86.
- Oliver, C., Ahn, B., Moermans, E., Goldstein, S., & Stadtman, E. (1987). Age-related Changes in Oxidized Proteins *. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(12), 5488–5491.
- Park, D., Xiong, Y. L., Alderton, A. L., & Oozumi, T. (2006). Concentration effects of hydroxyl radical oxidizing systems on biochemical properties of porcine muscle myofibrillar protein. *Food Chemistry*, 101, 1239–1246.
- Requena, J. R., Chao, C.-C., Levine, R. L., & Stadtman, E. R. (2001). Glutamic and aminoadipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences US*, 98, 69–74.
- Rossier, E. (1998). Horse meat. Review, Endocrinology. *Encyclopaedia of Food Science*.
- Rowe, L. ., Maddock, K. ., Lonergan, S. ., & Huff-Lonergan, E. (2004). Influence of early postmortem protein oxidation on beef quality. *Journal of Animal Science*, 82, 785–793.
- Saigas, A., Tanabe, S., & Nishimura, T. (2003). Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3661–3667.
- Santé-Lhoutellier, V., Aubry, L., & Gatellier, P. (2007). Effect of oxidation on in vitro digestibility of skeletal muscle myofibrillar proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5343–5348.
- Sarriés, M. V., & Beriain, M. J. (2005). Carcass characteristics and meat quality of male and female foals. *Meat Science*, 70(1), 141–152. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.12.006>
- Sarriés, M. V., & Beriain, M. J. (2006). Colour and texture characteristics in meat of male and female foals. *Meat Science*, 74(4), 738–745. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.06.005>
- Sarriés, M. V. (2005). *Carcass morphological characteristics and meat quality of the Burguete foal*. Universidad Pública de Navarra.
- Sarriés, M. V., Ruiz, M., Beriain, M. J., & Pérez de Muniáin, A. (2014). Evolución de la calidad de la carne de potro con el tiempo de conservación. *Navarra Agraria, septiembre*, 35–42.

- Sell, D. R., Strauch, C. M., Shen, W., & Monnier, V. M. (2008). 2-Aminoadipic acid is a marker of protein carbonyl oxidation in the aging human skin: Effects of diabetes, renal failure and sepsis. *Biochemical Journal*, 404, 269–277.
- Soyer, A., Ozalp, B., Dalmis, U., & Bilgin, V. (2010). Effects of freezing temperature and duration of frozen storage on lipid and protein oxidation in chicken meat. *Food Chemistry*, 120, 1025–1030.
- Srinivasan, S., Xiong, Y. L., & Decker, E. A. (1996). Inhibition of Protein and Lipid Oxidation in Beef Heart Surimi-like Material by Antioxidants and Combinations of pH , NaCl , and Buffer Type in the Washing Media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 119–125.
- Stadtman, E. R., & Levine, R. L. (2000). Protein oxidation. *Annals New York Academy of Sciences*, 899, 191–208.
- Stadtman, E. R. (2004). Role of Oxidant Species in Aging, 1105–1112.
- Stadtman, E. R., & Levine, R. L. (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, 25, 207–218.
- Stadtman, E. R., & Oliver, C. N. (1991). Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 2005–2008.
- Tateo, A., De pablo, P., Ceci, E., & Centoducati, P. (2008). Physicochemical properties of meat of Italian Heavy Draft horses slaughtered at the age of eleven months. *Journal of Animal Science*, 86, 1205–1214.
- USDA. (2013). National nutrient database for standard reference. Retrieved June 11, 2016, from <https://fnic.nal.usda.gov/food-composition/macronutrients/fats-and-cholesterol>
- Utrera, M., Morcuende, D., & Estévez, M. (2014). Temperature of frozen storage affects the nature and consequences of protein oxidation in beef patties. *MESCI*, 96(3), 1250–1257. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.10.032>
- Vourela, S., Hanna, S., Maija, M., Riitta, K., Maarit, K., & Marina, H. (2005). Effect of Plant Phenolics on Protein and Lipid Oxidation in Cooked Pork Meat Patties. *Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8492–8497.
- Xiong, Y. . (2000). Protein oxidation and implications for muscle foods quality. *New York :Wiley*.
- Xiong, Y. ., & Park, D. (2007). Oxidative modification of amino acids in porcine myofibrillar protein isolates exposed to three oxidizing systems. *Food Chemistry*, 103, 607–616.